

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2002-065261

(43)Date of publication of application : 05.03.2002

(51)Int.Cl. C12N 15/09
A01K 67/02
A01K 67/027
C12N 5/10
C12Q 1/02
G01N 33/15
G01N 33/50

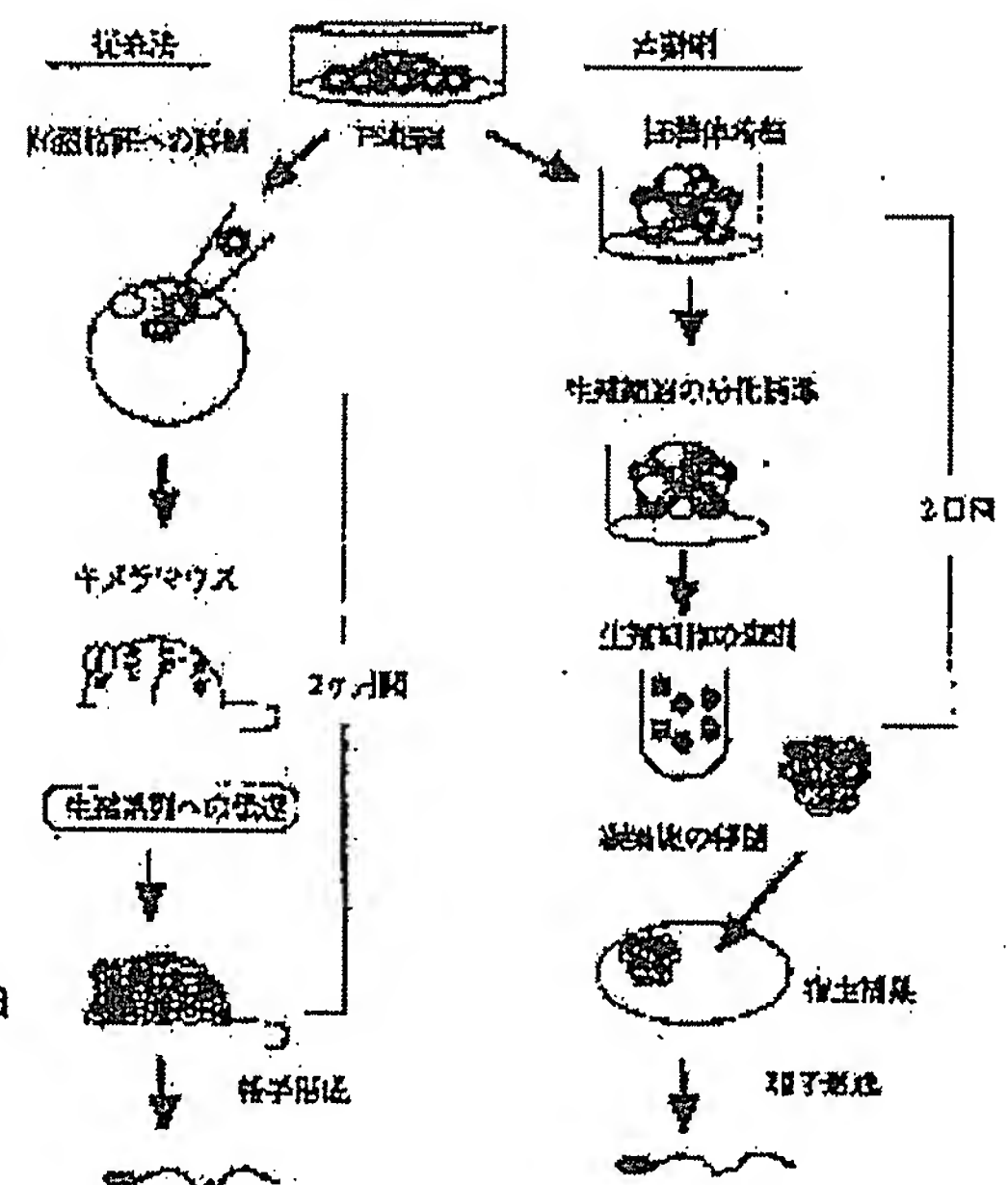
(21)Application number : 2000-260449 (71)Applicant : MITSUBISHI KASEI INSTITUTE
OF LIFE SCIENCES
(22)Date of filing : 30.08.2000 (72)Inventor : NOSE TOSHIAKI
TOYOOKA YAYOI

(54) METHOD FOR OBTAINING REPRODUCTIVE CELL

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for obtaining reproductive cells, intended for detecting the differentiation of reproductive cells from ES cells, sorting and purifying the reproductive cells thus differentiated under culture, and realizing a spermatogenesis from the reproductive cells derived from the ES cells.

SOLUTION: This method for obtaining reproductive cells is characterized by comprising the following process: an ES cell strain transferred with a marker gene so as to be put under the control of expressing Vasa gene or a homologous gene thereof is cultured in the presence of a reproductive cell differentiation promotive factor and the cells having the ability to differentiate reproductive cells are sorted with the expression of a marker gene as the indicator.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-65261

(P2002-65261A)

(43) 公開日 平成14年3月5日(2002.3.5)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テームト ⁸ (参考)
C 1 2 N 15/09		A 0 1 K 67/02	2 G 0 4 5
A 0 1 K 67/02		67/027	4 B 0 2 4
67/027		C 1 2 Q 1/02	4 B 0 6 3
C 1 2 N 5/10		G 0 1 N 33/15	Z 4 B 0 6 5
C 1 2 Q 1/02		33/50	Z
審査請求 未請求 請求項の数19 O L (全 15 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2000-260449(P2000-260449)

(22) 出願日 平成12年8月30日(2000.8.30)

特許法第30条第1項適用申請有り 平成12年5月25日
開催の「日本発生生物学会第33回大会」において文書を
もって発表

(出願人による申告) 国等の委託研究の成果に係る特許
出願 (平成12年度 科学技術庁 振興調整費知的基盤整
備推進制度科学技術総合研究、産学再生法第30条の適用
を受けるもの)

(71) 出願人 599071832

株式会社三菱化学生命科学研究所
東京都町田市南大谷11号

(72) 発明者 野瀬 俊明

東京都町田市南大谷11号 株式会社三菱化
学生命科学研究所内

(72) 発明者 豊岡 やよい

東京都町田市南大谷11号 株式会社三菱化
学生命科学研究所内

(74) 代理人 100096219

弁理士 今村 正純 (外3名)

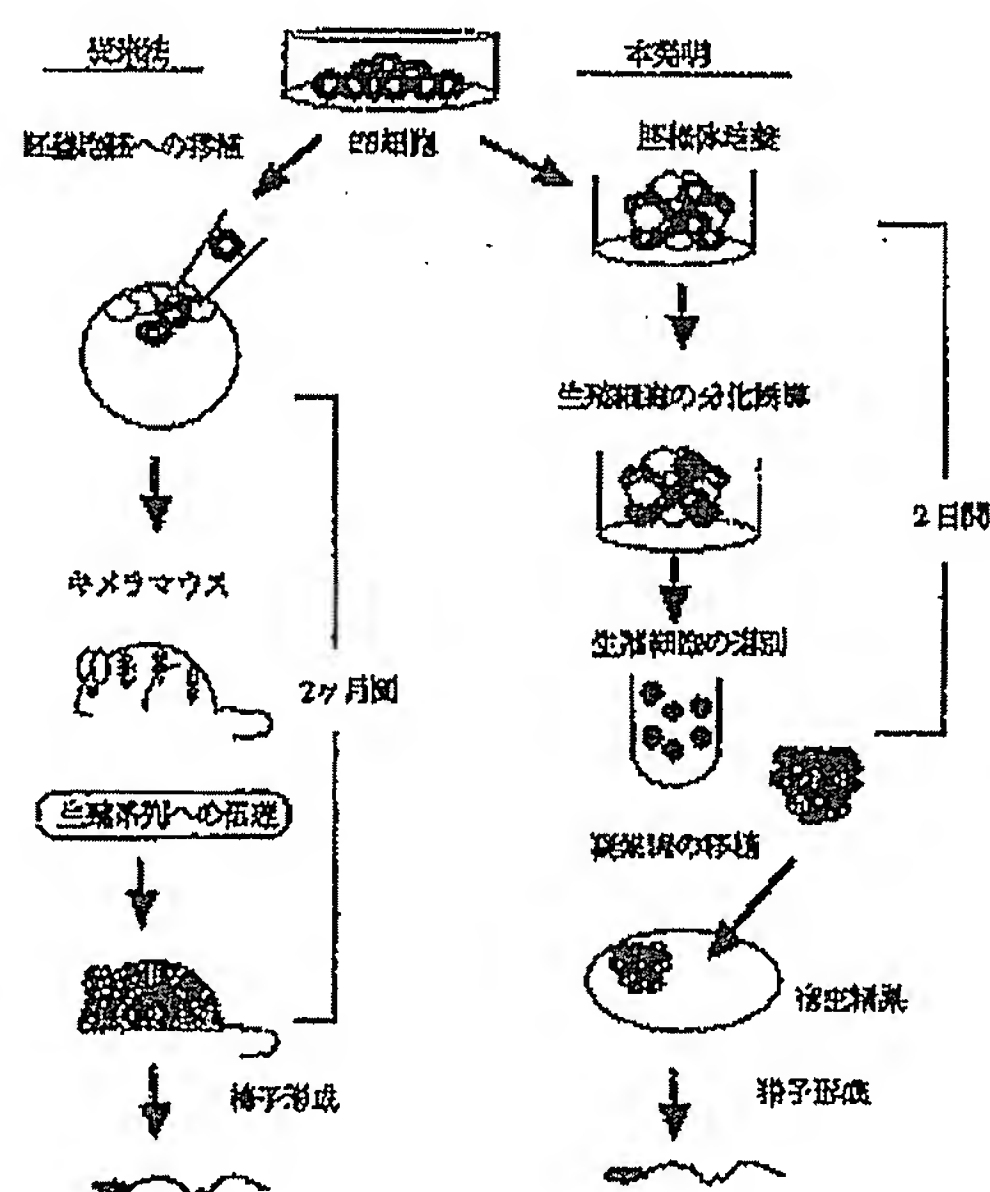
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生殖細胞の取得方法

(57) 【要約】

【課題】 ES細胞から生殖細胞の分化を検出可能にし、
培養下に分化した生殖細胞を選別精製して、ES細胞由来
の生殖細胞から精子形成を実現すること。

【解決手段】 Vasa遺伝子またはそのホモログ遺伝子発
現の制御下に置かれるようにマーカー遺伝子を導入した
ES細胞株を、生殖細胞分化促進因子の存在下で培養し、
マーカー遺伝子の発現を指標として生殖細胞分化能を有
する細胞を選択することを特徴とする。生殖細胞の取得
方法。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 Vasa遺伝子またはそのホモログ遺伝子発現の制御下に置かれるようにマーカー遺伝子を導入したES細胞株を、生殖細胞分化促進因子の存在下で培養し、マーカー遺伝子の発現を指標として生殖細胞分化能を有する細胞を選択することを特徴とする、生殖細胞の取得方法。

【請求項2】 ES細胞株に導入するマーカー遺伝子が、GFP、BFP、YFP、あるいはlacZ遺伝子である請求項1に記載の生殖細胞の取得方法。

【請求項3】 相同組換えによりマーカー遺伝子をES細胞株へ導入する、請求項1または2に記載の生殖細胞の取得方法。

【請求項4】 ES細胞株が哺乳類又は鳥類由来の細胞株である、請求項1から3の何れか1項に記載の生殖細胞の取得方法。

【請求項5】 分化促進因子がBMP4である、請求項1から4の何れか1項に記載の生殖細胞の取得方法。

【請求項6】 生殖細胞分化促進因子をコードする遺伝子を導入した細胞と、Vasa遺伝子またはそのホモログ遺伝子発現の制御下に置かれるようにマーカー遺伝子を導入したES細胞株とを共培養し、マーカー遺伝子の発現を指標として生殖細胞分化能を有する細胞を選択することを特徴とする、生殖細胞の取得方法。

【請求項7】 生殖細胞分化促進因子をコードする遺伝子が、BMP4をコードする遺伝子である、請求項6に記載の生殖細胞の取得方法。

【請求項8】 Vasa遺伝子またはそのホモログ遺伝子発現の制御下に置かれるようにマーカー遺伝子を導入したES細胞株を被験物質の存在下で培養し、該マーカー遺伝子の発現を誘起する被験物質を選択することを特徴とする、生殖細胞分化促進因子のスクリーニング方法。

【請求項9】 請求項8に記載の方法により得られる生殖細胞分化促進因子。

【請求項10】 請求項1から7の何れか1項に記載の方法により取得された生殖細胞を培養し、得られた細胞凝集塊を成体雄の精巣被膜下に移植し、形成された精細管構造を呈する細胞塊から細胞を取得することを特徴とするES細胞由来の精子の取得方法。

【請求項11】 生殖細胞の培養が、胎児雄性生殖巣由来細胞と共培養する方法である、請求項10に記載の精子の取得方法。

【請求項12】 請求項10又は11に記載の方法により取得される精子。

【請求項13】 Vasa遺伝子またはそのホモログ遺伝子発現の制御下に置かれるようにマーカー遺伝子を導入したES細胞株に外来遺伝子を導入することにより得られる組換え細胞株をES細胞株として用いて請求項1から7の何れかに記載の方法を行うことを特徴とする、遺伝子組換え生殖細胞の取得方法。

【請求項14】 請求項13に記載の遺伝子組換え生殖細胞の取得方法により取得される遺伝子組換え生殖細胞株を用いて、請求項10または11に記載の精子の取得方法を行うことを特徴とする、遺伝子組換え精子の取得方法。

【請求項15】 請求項14の方法により取得される遺伝子組換え精子。

【請求項16】 請求項10、11又は14に記載の方法により得られる精子を用いて、顕微受精によりES細胞由来の個体を作成する方法。

【請求項17】 Vasa遺伝子またはそのホモログ遺伝子発現の制御下に置かれるようにマーカー遺伝子を導入したES細胞株を被験物質の存在下で培養し、マーカー遺伝子の発現が誘起されている細胞数を指標として、生殖細胞への毒性を有する物質を検定することを特徴とする生殖細胞への毒性試験方法。

【請求項18】 Vasa遺伝子またはそのホモログ遺伝子発現の制御下に置かれるようにマーカー遺伝子を導入したES細胞株を、生殖細胞分化促進因子と被験物質の存在下で培養し、マーカー遺伝子発現が誘起されている細胞数を指標として、生殖細胞への毒性を有する物質を検定することを特徴とする、生殖細胞への毒性試験方法。

【請求項19】 Vasa遺伝子またはそのホモログ遺伝子発現の制御下に置かれるようにマーカー遺伝子を導入したES細胞株を被験物質の存在下でBMP4遺伝子導入細胞株と共に培養し、マーカー遺伝子発現が誘起されている細胞数を指標として、生殖細胞への毒性を有する物質を検定することを特徴とする、生殖細胞への毒性試験方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、生殖細胞の取得方法およびその利用法に関する。より詳細には、本発明は、Vasa遺伝子またはそのホモログ遺伝子発現の制御下に置かれるようにマーカー遺伝子を導入したES細胞株を、生殖細胞分化促進因子の存在下で培養することを含む生殖細胞の取得方法、およびその利用法に関する。

【0002】

【従来の技術】従来の遺伝子改変動物の作成法は、受精卵やES細胞を対象とした遺伝子操作を基盤としており、遺伝子導入細胞に由来する子孫個体を得るには、仮母親への移植操作の効率や導入遺伝子の配偶子形成への伝達効率が遺伝子改変動物作成の効率や作業期間の大きな律速点となっている。また、これらの手法は、主にES細胞株が樹立され、且つ世代期間の短い実験動物（マウス）に有効な方法であり、受精卵採取が困難であったり、世代期間の長い多くの家畜動物には実用的手法とは言い難い。また、現在、注目されている体細胞核移植によるクローン動物の作成に関しても、受精卵以降の胚操作過程は共通していることから、この問題は避けて通ることができない課題である。

【0003】一方、高等動物の雄性配偶子である精子産生は、自己再生能を持つ造精幹細胞の周期的分化によって担われ、その産生は個体の全生涯にわたって継続される。この発生学的特質に基づいて、精子細胞もしくはその核を用いた人工授精技術や精子の凍結保存技術など、生体の精子形成細胞から子孫個体を得る生殖工学技術は急速に発達し、現在これらの技術は既存のものとなりつつある。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】上述のように現行の遺伝子改変動物の作成では、受精卵もしくは胚盤胞期胚の生体移植操作が不可欠であり、その胚体において遺伝子操作細胞が如何に生殖細胞系譜に入るか、即ち精子形成に寄与するかが大きな鍵となる。この場合、いかなる形においても精子形成過程までの進行を達成すれば、精子細胞を用いた生殖工学技術によって遺伝子改変個体の獲得は可能である。そのため、本発明では、生殖細胞への分化過程を培養下に進行させること、次いで遺伝子操作細胞由来の生殖細胞を精製することによって確実に精子形成への寄与が期待できるシステムを確立することを解決すべき課題とした。この課題を實現するためには、克服すべき問題が2つある。

【0005】一つは、全能性細胞、具体的にはES細胞から生殖細胞の分化を検出可能にすることであり、もう一つは培養下に分化した生殖細胞を選別精製して、ES細胞由来の生殖細胞から精子形成を實現することである。前者については、これまで一般に生殖細胞の前駆体である始原生殖細胞を識別するのに用いられてきたOct3/4, SSEA-1抗原及びアルカリフォスファターゼ染色陽性による検出法が、ES細胞をはじめとする全能性細胞についても共通の形質であることから、ES細胞から始原生殖細胞への分化を識別する手段とならないことがin vitro生殖細胞分化誘導系の開発を阻む大きな原因となっていた。

【0006】

【課題を解決するための手段】ES細胞を浮遊培養することによって形成される胚様体は、培養後3～5日目以降に胚体外外胚葉細胞とともに内・中・外胚葉の胚体細胞の分化が見られる。同様の胚様体培養において生殖細胞の分化が起きていることは、生殖細胞特異的遺伝子Mvh(mouse vasa homolog)の発現(Fujimura et al., FWA 5, 91, 12258-12262, 1994; Toyooka et al., Mech. Dev., 93, 139-149, 2000)をlacZ及びGFP遺伝子のマーカー遺伝子発現によって可視化することによって検出可能となった。培養後5日目の胚様体においてマーカー陽性、即ちMvh発現陽性の生殖細胞は全体の約0.1～0.3%の頻度で出現する。

【0007】本発明者らの今回の研究により、TGFβスーパーファミリーに属する成長因子BMP4(bone morphogenetic Protein-4)を発現する細胞をES細胞と混合培養する操作によって、上記の生殖細胞出現頻度は全体の約3

～5% (約10～20倍)増加し、しかも、その出現は培養後1日の短期間に誘導されることが判明した。細胞選別装置(FACS)を用いることによってマーカー陽性細胞として分別された生殖細胞は、胎生10.5～13.5日目胎児生殖巣の始原生殖細胞(PCR)を特徴づけるOct3/4, SSEA-1, GCNA-1抗原及びアルカリフォスファターゼ陽性の特性を示す。本発明者らの今回の実験では、2度のFACS選別によってES細胞由来生殖細胞は90%以上に精製することが可能であった。

10 【0008】このES細胞由来生殖細胞が正常な精子形成能を持つことは、生体精巣への移植操作によって検定された。胎児生殖巣由来細胞と混合とした細胞凝集塊を精巣皮膜下に移植した場合、12.5日目始原生殖細胞と同様に移植塊内に精子形成が観察でき、上記移植法によってES細胞由来の精子が作成可能であった。

【0009】これらの結果は、上述の一連の操作が遺伝子改変操作を施したES細胞からキメラ動物の作成作業を経ることなく、極めて短時間かつ確実にES細胞由来の精子を獲得する優れた技術を提供できることを意味する。また、ES細胞からin vitro分化誘導される生殖細胞が正常の発生能を示したことは、この分化誘導系がES細胞の全能性検定および生殖細胞成立に対する化学物質の鏡乱作用検定系に利用できることを示している。本発明はこれらの知見に基づいて完成したものである。

【0010】即ち、本発明の第1の態様によれば、Vasa遺伝子またはそのホモログ遺伝子発現の制御下に置かれるようにマーカー遺伝子を導入したES細胞株を、生殖細胞分化促進因子の存在下で培養し、マーカー遺伝子の発現を指標として生殖細胞分化能を有する細胞を選択することを特徴とする、生殖細胞の取得方法が提供される。好ましくは、ES細胞株に導入するマーカー遺伝子は、GFP, BFP, YFP, あるいはlacZ遺伝子である。好ましくは、相同組換えによりマーカー遺伝子はES細胞株へ導入される。好ましくは、ES細胞株は哺乳類又は鳥類由来の細胞株である。好ましくは、分化促進因子はBMP4である。

【0011】本発明の第2の態様によれば、生殖細胞分化促進因子をコードする遺伝子を導入した細胞と、Vasa遺伝子またはそのホモログ遺伝子発現の制御下に置かれるようにマーカー遺伝子を導入したES細胞株とを共培養し、マーカー遺伝子の発現を指標として生殖細胞分化能を有する細胞を選択することを特徴とする、生殖細胞の取得方法が提供される。好ましくは、生殖細胞分化促進因子をコードする遺伝子は、BMP4をコードする遺伝子である。

【0012】本発明の第3の態様によれば、Vasa遺伝子またはそのホモログ遺伝子発現の制御下に置かれるようにマーカー遺伝子を導入したES細胞株を被験物質の存在下で培養し、該マーカー遺伝子の発現を誘起する被験物質を選択することを特徴とする、生殖細胞分化促進因子

のスクリーニング方法が提供される。本発明の第4の態様によれば、本発明の第3の態様である生殖細胞分化促進因子のスクリーニング方法により得られる生殖細胞分化促進因子が提供される。

【0013】本発明の第5の態様によれば、本発明の第1の態様である生殖細胞の取得方法により取得された生殖細胞を培養し、得られた細胞凝集塊を成体雄の精巣被膜下に移植し、形成された精細管構造を呈する細胞塊から細胞を取得することを特徴とするES細胞由来の精子の取得方法が提供される。好ましくは、生殖細胞の培養は、胎児雄性生殖巣由来細胞と共培養する方法である。

【0014】本発明の第6の態様によれば、本発明の第5の態様であるES細胞由来の精子の取得方法により取得される精子が提供される。本発明の第7の態様によれば、Vasa遺伝子またはそのホモログ遺伝子発現の制御下に置かれるようにマーカー遺伝子を導入したES細胞株に外来遺伝子を導入することにより得られる組換え細胞株をES細胞株として用いて、本発明の第1の態様である生殖細胞の取得方法を行うことを特徴とする、遺伝子組換え生殖細胞の取得方法が提供される。

【0015】本発明の第8の態様によれば、本発明の第7の態様である遺伝子組換え生殖細胞の取得方法により取得される遺伝子組換え生殖細胞株を用いて、本発明の第5の態様である精子の取得方法を行うことを特徴とする、遺伝子組換え精子の取得方法が提供される。本発明の第9の態様によれば、本発明の第8の態様である遺伝子組換え精子の取得方法により得られる遺伝子組換え精子が提供される。

【0016】本発明の第10の態様によれば、本発明の第5又は第8の態様である精子の取得方法により得られる精子を用いて、顕微受精によりES細胞由来の個体を作成する方法が提供される。

【0017】本発明の第11の態様によれば、Vasa遺伝子またはそのホモログ遺伝子発現の制御下に置かれるようにマーカー遺伝子を導入したES細胞株を被験物質の存在下で培養し、マーカー遺伝子の発現が誘起されている細胞数を指標として、生殖細胞への毒性を有する物質を検定することを特徴とする生殖細胞への毒性試験方法が提供される。

【0018】本発明の第12の態様によれば、Vasa遺伝子またはそのホモログ遺伝子発現の制御下に置かれるようにマーカー遺伝子を導入したES細胞株を、生殖細胞分化促進因子と被験物質の存在下で培養し、マーカー遺伝子発現が誘起されている細胞数を指標として、生殖細胞への毒性を有する物質を検定することを特徴とする、生殖細胞への毒性試験方法が提供される。

【0019】本発明の第13の態様によれば、Vasa遺伝子またはそのホモログ遺伝子発現の制御下に置かれるようにマーカー遺伝子を導入したES細胞株を被験物質の存在下でBMP4遺伝子導入細胞株と共に培養し、マーカー遺

伝子発現が誘起されている細胞数を指標として、生殖細胞への毒性を有する物質を検定することを特徴とする、生殖細胞への毒性試験方法が提供される。

【0020】

【発明の実施の形態】以下、本発明の実施方法および実施態様について詳細に説明する。ES細胞から胎原生殖細胞への分化を識別するには、ES細胞には発現せず、分化した生殖細胞に特異的に発現する形質を指標にする必要がある。生殖細胞特異的遺伝子Mvh(mouse vasa homolog)は、生殖巣内に定住した後期胎原生殖細胞に特異的であり、それ以前の未分化初期胚細胞やES細胞には発現が認められないこと(Fujiwara et al., 1994; Toyooka et al., 2000)から、本発明ではVasa遺伝子またはそのホモログ遺伝子発現を生殖細胞の分化指標として用いることとした。但し、ES細胞の浮遊培養で形成される胚様体では、生体内と同様に三胚葉を含む様々な細胞種の分化が起こり、生殖細胞の出現頻度は極めて少ないと考えられる。そのため、従来の分子遺伝学的検出法や免疫組織学的染色法では正確な識別ができないことが予想された。本発明では、この問題を克服する手段として、Vasa遺伝子またはそのホモログ遺伝子発現をGFP(発光クラゲの緑色蛍光蛋白質)およびlacZ(バクテリア由来のガラクトシダーゼ酵素; 発色基質によって青色呈色或いは発光基質によって発光発色が可能となる)遺伝子などのマーカー遺伝子の発現に置き換える遺伝子改変操作を施し、Vasa遺伝子またはそのホモログ遺伝子発現の制御下に置かれるように上記マーカー遺伝子を導入したES細胞株を作製した。

【0021】より具体的にはGFPおよびlacZ遺伝子を組同組換えによってMvh遺伝子座にknock-in(挿入)したES細胞クローンを樹立し(図1参照)、Mvh遺伝子発現をlacZ(GFP)発現によって可視化する方策を取った。これにより、分化した生殖細胞を固定標本とすることなく、生きたまま高感度に検出する手段となると同時に、分化した生殖細胞を他の細胞種から分別精製することが可能になる。

【0022】次に、より多くの生殖細胞を獲得するため、培養分化誘導系の優位点を生かして、生殖細胞の分化促進条件を検討した。生体内では胎原生殖細胞は胚体外組織(胎盤前駆組織)からの局所的な分化誘導作用を受けて分化すると推定されている。さらに、ノックアウトマウス解析から、胚体外組織に発現するBMP4遺伝子の破壊は胎原生殖細胞の欠損をもたらすことが報告され(Lawson et al., Genes & Dev., 13, 424-436, 1999)、BMP4が生殖細胞分化促進因子となる可能性が考えられた。本発明では、BMP4蛋白質を強制発現するベクターを遺伝子導入したBMP4発現細胞を樹立し、これをES細胞と均等に混合した上で胚様体形成を行った場合、10倍以上の出現頻度の増加が起こることを見出した。

【0023】さらに、培養下に分化した生殖細胞は細胞

選別装置(FACS)によって容易に精製することができる。この生殖細胞が生体内始原生殖細胞と同様の発生能を持つことを検証し、ES細胞由来の精子細胞を形成する手段として、精製細胞に由来する細胞塊を生体精巣内に挿入移植する方法を用いた。この手法では、移植片は宿主組織とは分離して独自の精細管組織を構築するため、ES細胞由来の精子細胞は宿主精子と混合することなく、容易に分離精製することが可能となる。以下、本発明についてさらに詳細に説明する。

【0024】1. 胚葉体形成におけるVasa遺伝子またはそのホモログ遺伝子発現生殖細胞の分化

ES細胞はLIF (Leukemia Inhibitory Factor) 存在下では未分化性を維持し、約24時間の早い分裂周期を持って増殖するが、LIF非存在下では増殖率が低下するとともに初期胚と同様の細胞分化を起こす。特に、浮遊培養によって細胞塊を形成すると胚葉体と呼ばれる内・中・外胚葉性の複数の細胞層からなる球状組織構造が形成される。このES細胞のin vitro 分化において、生殖細胞系譜の分化が起こるか否かを生殖細胞特異的Vasa遺伝子またはそのホモログ遺伝子の発現で検出するシステムについては、ES細胞にVasa遺伝子またはそのホモログ遺伝子発現の制御下に置かれるようにマーカー遺伝子を導入し、これを適当な条件下で培養する方法が用いられる。これらは例えば、以下の方法を用いて行うことができる。Vasa遺伝子またはそのホモログ遺伝子発現細胞の高感度可視化検出を可能にするため、相同組換えによって該遺伝子座にIRES-lacZ発現カセットおよびIRES-GFP発現カセット等を挿入置換(ノックイン)したマーカー遺伝子導入ES細胞株を樹立する。この可視化マーカー遺伝子の導入により、Vasa遺伝子またはそのホモログ遺伝子発現細胞の存在をLacZの酵素活性染色、またはGFPの蛍光発光等により定量的に識別することができる。実際に、GFP遺伝子によりMsh遺伝子をノックインしたES細胞株をLIFを含まない培養液を用いて浮遊培養し、胚葉体形成を行ってGFP陽性細胞の出現を検討した結果、最も早期には培養後3日目の胚葉体において、僅かながらMsh遺伝子発現細胞の出現が認められ、培養後5日目の胚葉体ではさらにGFP陽性細胞が増加し、全体の約1割の胚葉体にMsh遺伝子発現細胞の存在が観察された。同様に、lacZをマーカー遺伝子として導入した場合も、Msh発現生殖細胞の出現はlacZノックインES細胞を用いた胚葉体形成において観察された。このMsh発現生殖細胞の出現は、LIF存在下(103 units/ml)で浮遊培養した場合(胚葉体と類似の細胞塊が形成される)には検出されず、LIF非存在下でも通常の組織培養プレートで培養した場合(細胞塊の形成はない)には検出されないことから、その出現にはLIF非存在下で細胞塊を形成することが必要である。

【0025】本明細書で言うVasa遺伝子またはそのホモログ遺伝子とは、好ましくは哺乳動物(例えば、マウ

ス、ヒト、ブタ、ウシ、ヒツジ、ラット等)のVasa遺伝子を意味する。なお、Vasa遺伝子およびそのホモログ遺伝子は公知であり、例えば、ラット(Komiya et al., Dev. Biol., 152, 354-363, 1994)、ニワトリ(Tsunekawa et al., Development, 127, 2740-2750, 2000)、ゼブラフィッシュ(Yoon et al., Development, 124, 3157-3165, 1999)等に記載されている。

【0026】本明細書で言うマーカー遺伝子とは、その発現を容易に検出または測定できる遺伝子である限りその種類は特に限定されず、例えば、GFP、BFB、YFP、あるいはlacZ遺伝子などが挙げられる。また、マーカー遺伝子を導入するための発現カセットには、IRES (Internal ribosome entry site: Jackson, R.J., et al., Trends Biochem Sci., 15(12), 477-483, 1990)をマーカー遺伝子の5'側に連結するようにして用いると、マーカー遺伝子の機能発現に有利である。

【0027】Vasa遺伝子またはそのホモログ遺伝子発現の制御下に置かれるようにマーカー遺伝子を導入する態様としては、(1) Vasa遺伝子またはそのホモログ遺伝子のプロモーターの下流にマーカー遺伝子を該プロモーターの制御下に置かれるように導入する態様、並びに、(2) Vasa遺伝子またはそのホモログ遺伝子のプロモーターを連結させたマーカー遺伝子をES細胞株に導入する態様の2つが挙げられる。上記の第1の態様でマーカー遺伝子を導入する場合には、該遺伝子をVasa遺伝子又はそのホモログ遺伝子のDNA配列の間にリーディングフレームを合わせるように挿入してもよいし、その一部又は全部と入れ換えて導入することもできる。導入する方法としては、相同組換えを用いることができる。上記の第2の態様でマーカー遺伝子を導入する場合は、Vasa遺伝子又はそのホモログ遺伝子のプロモーターを直結させたマーカー遺伝子の導入部位は特に制限されない。また、導入の方法もそれ自体既知の遺伝子導入法を用いて行うことができる。これらのうち、マーカー遺伝子とその5'側に連結したIRES配列よりなる発現ユニットを相同組換えによりVasa遺伝子又はそのホモログ遺伝子の一部と入れ換えて導入することが好ましい。

【0028】本発明で用いるES細胞株の種類は特に限定されないが、哺乳類又は鳥類由来の細胞株が好ましい。具体的には、マウス129系統雄由来E14細胞株およびこれに由来するE14TG2a細胞株、ヒトES細胞株H9 (Thomson et al., Science, 282, 1145-1147, 1998)等が挙げられる。

【0029】2. Vasa遺伝子又はそのホモログ遺伝子発現生殖細胞の精製分取

マーカー遺伝子発現が誘導された細胞は、マーカーにより発せられる信号を検出することにより分離精製を行うことができる。信号の検出法、及び細胞の分離精製法はそれ自体既知の適当な方法を用いることができる。具体的には例えば以下に記載するように行うことができ

る。ノックインES細胞胚葉体において分化誘導されたlacZ/GFP陽性生殖細胞をセルソーター（FACS）による分離精製を行う。lacZノックインES細胞の5日目胚様体をコラゲネースにより分散し、分散細胞をlacZ酵素活性で生体蛍光染色した後、FACSを用いて分析し、lacZ陽性細胞を分取する。以下の実施例では、lacZ陽性分画に分取された細胞は全体の0.1〜0.3%であった。このようにして精製されるlacZ陽性細胞はMvh抗体染色に陽性であることから、実際に内在性Mvh発現細胞であることが確認される。同時に、胎児生殖細胞の識別指標のOct3/4抗体染色、AP染色、およびSycp3蛋白質の検出について陽性であることを確認することにより、既存の胎原生殖細胞識別指標のほぼ全てにおいて生殖細胞の特質を持つことを確認できる。

【0030】3. 共培養による生殖細胞の分化誘導効果
本発明では、上記のES細胞を用いたin vitro分化系において、Mvh発現細胞の出現頻度を指標にして生殖細胞分化をより効率的に促進する方法も提供される。生体内では、胎生6.0〜6.5日目胚において胚体外組織からエピプラストに対して、何らかの生殖細胞分化誘導作用が働くことが推定されている。そこで予備実験として、7.5日目胚の胚体外外胚葉を摘出し、FGF4を含む培地で長期培養（約1ヶ月）によって増殖させた胚体外外胚葉由来初代培養細胞とノックインES細胞を等量混合して細胞塊を形成させる共培養を行った結果、その培養開始後1日目において、ほとんど全ての細胞塊においてMvh発現細胞の出現が観察され、Mvh発現細胞の頻度はES細胞単独培養よりも遥かに高い誘導促進が認められた。これは、胚体外外胚葉細胞に生殖細胞の分化促進作用があることを示すとともに、in vitro培養分化系が生体内で起こる生殖細胞分化の特性を正しく反映していることを示すものである。

【0031】また、胎仔（15.5日目胚）生殖隆起体細胞に由来するML5細胞株に、CMVプロモーターによって胚体外外胚葉が持つ分化誘導シグナルの候補因子とされるBMP4全長配列を発現するベクターを遺伝子導入して、BMP4蛋白質を強制発現するML5細胞株（BMP4-ML5）を作成した。このBMP4-ML5細胞とGFPノックインES細胞を1:1混合した混合細胞塊を検討した結果、培養開始後1日目にMvh発現細胞の出現が観察された。なお、対照実験として行った野生型ML5細胞の共培養では、1日目にMvh発現細胞は全く見られなかった。FACS解析によって、その出現頻度は約3%と算定され、ES細胞単独の胚様体（5日目）の場合の6〜10倍に相当する。また、この1回目のFACS精製によって分取された細胞分画の80%以上はMvh発現細胞であり、再度この陽性分画をFACS精製に掛けた分画は95%以上の純度を示した（図3参照）。これらの結果より、Vasa遺伝子またはそのホモログ遺伝子の発現の制御下に置かれるようにマーカー遺伝子を導入したES細胞株は、FGF、BMP4等の生殖細胞分化促進因子の存在下で培

養することにより、マーカー遺伝子陽性細胞の分化誘導が促進できることが分かった。

【0032】また、生殖細胞分化促進因子は、それをコードする遺伝子を導入した細胞とVasa遺伝子またはそのホモログ遺伝子発現の制御下に置かれるようにマーカー遺伝子を導入したES細胞を共培養することにより供給されることが好ましいことも明らかになった。導入する細胞としては、本発明で用いるES細胞と同じ培養系において培養可能であって、導入した生殖細胞分化促進因子遺伝子が発現する細胞であればいかなるものであってもよいが、好ましくは中胚葉系の細胞等、さらに好ましくは生殖隆起体細胞に由来する細胞であるML5（Rassoulzadegan et al., Cell, 75, 997-1005, 1993）が好ましく用いられる。生殖細胞分化促進因子をコードする遺伝子を含む発現カセットとしては、生殖細胞分化促進因子が細胞内で適当量発現するのに適しているものであればいかなるものであってもよいが、例えば生殖細胞分化促進因子をコードする遺伝子の5'側に適当なプロモーター配列が追加したものをを用いることができる。

【0033】用いられるプロモーターとしては、該発現カセットを導入した細胞内で、生殖細胞分化促進因子を生生殖細胞分化を促進するのに十分な量発現させるようなものであればいかなるものであってもよい。具体的には、例えば、CMVプロモーターが好ましく用いられる。発現カセットの上記した細胞への導入、及び生殖細胞分化促進因子強制発現細胞の培養については、それ自体既知の適当な方法を用いることができる。このようにして取得された生殖細胞分化促進因子導入細胞を、Vasa遺伝子またはそのホモログ遺伝子発現の制御下に置かれるようにマーカー遺伝子を導入したES細胞とを共培養することにより、該ES細胞の生殖細胞への分化を促進する。共培養する場合の両細胞の割合としては、培養スケールや、用いるプロモーターの種類によって適宜選択される。具体的には、生殖細胞分化促進因子導入細胞の全体細胞数に対する割合が、1%以上であれば生殖細胞への分化促進が誘導されるが、好ましくは、10〜50%程度である。

【0034】上記した生殖細胞のin vitro分化誘導条件及び精製条件は、ノックイン操作をしたES細胞を用いて得られたものであるが、同様にVasa遺伝子またはそのホモログ遺伝子発現細胞の挙動を指標にすることによって他の遺伝子操作処理を施したES細胞或いは無処理のES細胞についても適用が可能であると考えられる。また、Mvh抗体染色は他の哺乳動物生殖細胞にも交叉反応すること、Vasaホモログ遺伝子は種を越えて非常に保存性が高いことから、ヒト、ブタ等の他の哺乳類ES細胞についても適用が可能と考えられる。

【0035】4. In vitro分化したVasa遺伝子またはそのホモログ遺伝子発現生殖細胞に由来する精子形成
上記3で記載したようにin vitro分化誘導後にFACS精製

された生殖細胞が、生体内で発生した生殖細胞と同様の発生能を持つが否かは、生体精巣被膜下への移植法によって検討することができる。生体精巣被膜下への移植は、FACS精製したES由来細胞と胎仔(12.5日目胚)雄生殖巣由来の分散細胞を混合し、1日間の浮遊培養によって細胞凝集塊を形成させ、この凝集塊を成体雄ヌードマウスの精巣被膜下に移植して生体内培養を行えばよい。培養開始から1〜2ヶ月後、移植精巣内において移植細胞塊は、宿主精巣とは分離した形で独自の精細管構造を形成する。組織学的解析からその精細管内部にはES由来生殖細胞が定着し、精子形成像が観察された。これらの結果より、上記3で取得した生殖細胞を培養し、得られた細胞凝集塊を成体雄の精巣被膜下に移植し、形成された精細管構造を呈する細胞塊から細胞を取得することにより、ES細胞由来の精子を取得できることが明らかとなった。

【0036】また、取得した生殖細胞の培養は、胎児雄性生殖巣由来細胞と共培養することによれば、さらに好ましいことも分かった。取得した生殖細胞の培養法は、それ自体既知の細胞凝集塊が形成されるような培養法であればいかなるものであってもよい。具体的には浮遊培養法が好ましく用いられる。この培養の際、上記したような胎児雄性生殖巣由来細胞と共培養することが好ましい。胎児雄性生殖巣由来の細胞としては、適当な動物の胎児の雄性生殖巣を適当な既知の方法により分散させた細胞を用いることができる。混合の割合は、特に制限はないが、胎児雄性生殖巣由来細胞が全体の細胞数に対し、50%程度が好ましい。形成された細胞凝集塊の取得、及び動物成体の精巣被膜下への移植の方法は、例えばHashimoto N, et al., J. Exp. Zool., 253, 61-70, 1990に記載の方法を用いることができる。移植を行う動物としては、外来細胞の移植に適した動物、例えば、ヌードマウス等が好ましく用いられる。移植を行った動物を適当な期間飼育した後、ES細胞由来の生殖細胞により形成された精細管構造を取得することにより、ES細胞由来の精子を取得することができる。移植組織の精細管は閉鎖系であり、宿主精子が混入する恐れはなく極めて高純度に抽出することができる。上記のようにして取得した精子を用いた精子顕微注入法による人工受精を介して産仔を得ることが可能である。精子顕微注入法、人工受精法および産仔の取得法については、例えば、Kimura Y, et al., Development, 121, 2397-2405, 1995に記載の方法によることができる。

【0037】5. 生殖細胞分化促進因子のスクリーニング方法

本発明はまた、Vasa遺伝子またはそのホモログ遺伝子発現の制御下に置かれるようにマーカー遺伝子を導入したES細胞株を被験物質の存在下で培養し、該マーカー遺伝子の発現を誘起する被験物質を選択することを特徴とする、生殖細胞分化促進因子のスクリーニング方法、並び

に該スクリーニング方法により得られる生殖細胞分化促進因子にも関する。被験物質の種類は特に限定されないが、例えば、ペプチド、ポリペプチド、合成化合物(低分子有機化合物、高分子有機化合物など)、微生物発酵物、生物体(植物又は動物の組織、微生物、又は細胞などを含む)からの抽出物、あるいはそれらのライブラリーが挙げられる。ライブラリーとしては、合成化合物ライブラリー(コンビナトリアルライブラリーなど)、ペプチドライブラリー(コンビナトリアルライブラリーなど)などが挙げられる。スクリーニングの被験物質は、天然物でも合成物でもよく、また候補となる単一の被験物質を独立に試験しても、いくつかの候補となる被験物質の混合物(ライブラリーなどを含む)について試験をしてもよい。また、細胞抽出物のような混合物を分画したのについてスクリーニングを行い、分画を重ねて、最終的にマーカー遺伝子の発現を誘起する物質を単離することも可能である。

【0038】5. 遺伝子組換え生殖細胞及び遺伝子組換え精子の取得方法

本発明はまた、Vasa遺伝子またはそのホモログ遺伝子発現の制御下に置かれるようにマーカー遺伝子を導入したES細胞株に外来遺伝子を導入することにより得られる組換えES細胞株を生殖細胞分化促進因子の存在下で培養し、マーカー遺伝子の発現を指標として生殖細胞分化能を有する細胞を選択することを特徴とする、遺伝子組換え生殖細胞の取得方法にも関する。ES細胞株に導入する外来遺伝子の種類は特に限定されないが、例えば、ペプチドホルモン、神経伝達因子、成長因子等の生理活性物質およびワクチン等の免疫増強物質やネオマイシン耐性因子等の薬剤耐性物質などが挙げられる。これ以外にも、例えば機能が未知のcDNA等も導入することができる。このような外来遺伝子の発現のために適当なプロモーター配列を該遺伝子の5'側に結合させて導入することができる。

【0039】外来遺伝子の導入方法は特に限定されず、通常の遺伝子導入法を使用できる。外来遺伝子の導入位置も特に限定されず、目的等に応じて適宜選択できる。外来遺伝子は、Vasa遺伝子またはそのホモログ遺伝子発現の制御下に置かれるように導入したマーカー遺伝子の発現に悪影響を及ぼさないように導入することが好ましい。上記のようにして取得した遺伝子組換え生殖細胞株を用いて、上記4に記載したようにして遺伝子組換え精子を取得することもできる。

【0040】7. 生殖細胞への毒性試験方法

本発明はまた、Vasa遺伝子またはそのホモログ遺伝子発現の制御下に置かれるようにマーカー遺伝子を導入したES細胞株を被験物質の存在下で培養し、マーカー遺伝子の発現が誘起されている細胞数を指標として、生殖細胞への毒性を有する物質を検定することを特徴とする生殖細胞への毒性試験方法にも関する。ES細胞株を被験物質

の存在下で培養する際に、生殖細胞分化促進因子を存在させてもよく、より好ましくはBMP4遺伝子導入細胞株と共に培養する。生殖細胞への毒性を有する物質（試験物質）の種類は特に限定されないが、例えば、ペプチド、ポリペプチド、合成化合物（低分子有機化合物、高分子有機化合物など）、微生物発酵物、生物体（植物又は動物の組織、微生物、又は細胞などを含む）からの抽出物、あるいはそれらのライブラリーが挙げられる。ライブラリーとしては、合成化合物ライブラリー（コンビナトリアルライブラリーなど）、ペプチドライブラリー（コンビナトリアルライブラリーなど）などが挙げられる。試験物質は、天然物でも合成物でもよく、また候補となる単一の試験物質を独立に試験しても、いくつかの候補となる試験物質の混合物（ライブラリーなどを含む）について試験をしてもよい。また、細胞抽出物のような混合物を分画したものについてスクリーニングを行い、分画を重ねて、最終的にマーカー遺伝子の発現を誘起する物質を単離することも可能である。より具体的には、内分泌攪乱物質（環境ホルモン）などを生殖細胞への毒性を有する物質として本発明の毒性試験方法で評価することができる。以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例のみに限定されるものではない。

【0041】

【実施例】実施例1：MnノックインES細胞株の樹立

129/svj系統のマウスゲノムライブラリーから単離したMnゲノム遺伝子クローンを基に、そのファージクローンから切り出された2.2kbのXbaI-SpeIのゲノム断片および1.2kbのXbaI-XhoIの断片をそれぞれ3'側および5'側の相同ランニング領域として使用し、翻訳開始点を含む第2エクソンより3.0kb下流のゲノム領域をIRES-LacZ+pGK-neo（ネオマイシン耐性遺伝子）またはIRES-GFP+pGK-neoカセットと置換するノックインベクターを作製した（図1参照）。なお、ネガティブ選択のためのMC1DT-A（シブテリア毒素）発現カセットをベクターの3'領域に付加した。線状化したノックインベクターをES細胞株（E14TG2a）にエレクトロポレーションにより導入し、G418の存在下（175 μ g/ml）で5〜7日間薬剤耐性による選択を行った。G418耐性のES細胞クローン（およそ40株）から、0.7 kb HindIII-XbaI および2.5 kb EcoRI-PstI断片をそれぞれ3'側および5'側の相同組換えを検出するプローブとしたサザンブロット解析を行い、IRES-LacZおよびIRES-GFPのノックインベクター各々について、組換え体ES細胞クローンを選別した。得られたES細胞クローンを用いて、以下のin vitro分化誘導系を構築した。

【0042】実施例2：胚様体形成における生殖細胞の分化とBMP4発現支持細胞との共培養による分化誘導の促進

ES細胞株の培養には、E14TG2細胞株用培地〔グラスボー（Glasgow）イーグル培地（GMEM；ギブコ社）、10% ウシ胎

児血清、100 μ M 非必須アミノ酸（Gibco）、1mM ビルビン酸ナトリウム（ギブコ社）、107 units/ml Leukemia Inhibitory Factor（LIF；ギブコ社）、 10^{-4} Mの 2-メルカプトエタノール〕を用いて、通常はゼラチンコート処理を施した直径6cmの培養ディッシュ中に継代培養した。支持細胞として用いた培養細胞株、例えばマウス体細胞10.5日目胚の生殖単体細胞由来の細胞株であるML細胞株の維持、およびES細胞の胚様体形成には、DMEM（ギブコ社）、10% FCS、100 μ M 非必須アミノ酸（ギブコ社）、1 mM ビルビン酸ナトリウム（ギブコ社）を培養液として使用した。

【0043】胚様体形成にはES細胞を 1×10^5 細胞/mlの密度に懸濁し、浮遊培養用組織培養プレートで37°C、5%二酸化炭素濃度下で培養後、経時的にMn発現細胞の出現を検定した。GFPノックインES細胞の場合は、蛍光顕微鏡下で観察し、lacZノックインES細胞の場合は、X-gal染色法によって、Mn発現細胞の出現を検出した（図2参照）。X-gal染色は、培養細胞をPBSで洗浄した後、氷冷した固定液（1%パラホルムアルデヒド、0.2%グルタルアルデヒド / PBS）で5分間固定を行い、氷冷したPBSで3回洗浄を行った後、X-gal染色液（50mg/ml X-gal（宝酒造）、5mM $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ 、5mM $K_3Fe(CN)_6$ 、2mM $MgCl_2$ / PBS）により37°Cで12〜24時間の発色反応を行うもので、lacZ陽性細胞は青色に呈色される。

【0044】BMP4を強制発現するマウス細胞の樹立には、CMプロモーターとネオマイシン耐性遺伝子を持ち任意の外來遺伝子を挿入可能な哺乳類細胞用発現ベクター（pTarget、プロメガ社）にBMP4のcDNAを挿入したBMP4強制発現ベクターを作製した。エレクトロポレーション法により遺伝子導入、ネオマイシン耐性による選別を行い、BMP4強制発現ベクターを取り込んだ耐性細胞株を樹立した。この導入BMP4遺伝子の発現は樹立株のmRNAについてBMP4特異的なRT-PCR検出を行うことで確認可能である。図3では上述したML細胞を用いているが、分化誘導効果と宿主細胞の細胞種には特異性がないことが判明している。ES細胞と等量のBMP4強制発現細胞を混合し、上記と同様の胚様体形成培養を行った結果、1日の培養条件においてMn発現細胞の出現が検出されただけでなく、その出現頻度もES単独の場合の10倍前後にも達した。

【0045】実施例3：FACS装置による細胞の分析と分画

胚様体を遠心操作により回収し、0.01%コラゲネース（シグマ社）を含むPBS中に懸濁し、37°Cで30分間の酵素反応を行った。ピペッティング操作により胚様体の細胞を分散した後、再び遠心操作を行ってコラゲネースを除去した。細胞は、PBSで洗浄した後、フェノールレッドを含まないDMEM +10% FCS 中に 10^5 /ml以下の細胞密度になるよう分散し、FACS（FACStarPLUS、日本ベクトン・ディッキンソン）を用いて細胞の精製および分析を

行った。細胞選別の条件設定および解析用のソフトとしてConsort-30を使用した。lacZ発現細胞の解析の際にはlacZ生体染色基質(Imagene green Cl2FDG lacZ 遺伝子発現キット; Molecular Probes社)を用い、細胞を固定しない状態で染色(37°Cで30分)し分別した。図みに1回の選別操作によって、およそ10⁵細胞が陽性分画に回収された。ここで得られた陽性分画は、以下の生殖細胞形質の検定及び生体移植での発生能の検定に用いた。

【0046】実施例4：免疫組織化学的染色による生殖細胞形質の検定

FACSによる選別を行った細胞は4%パラホルムアルデヒドによる固定とPBSによる洗浄後、サイトスピンによる遠心操作によってスライドガラス上に接着し、ブロッキング液[0.1% BSA (Bovin Serum Albumen, Sigma)/PBS-T]にてブロッキング反応を行った後(室温、60分)、1次抗体液と一晩(4°C)反応させた。1次抗体の希釈率はMh抗体の場合は1:1000、Gct3/4抗体および5ycp抗体は1:100で反応液を用いた。反応後、PBSで3回(15分)洗浄し、2次抗体としてはAP(アルカリフォスファターゼ)標識もしくはHRP(ペルオキシダーゼ)標識抗ウサギIgG(Bio-Rad社)と30分反応を行った。PBSで3回洗浄した後、抗体反応はBCIP/NBT溶液(AP標識抗体)ならびにDAB染色液[0.05% 3,3'-diamino-benzidine, 0.01% H₂O₂/PBS]溶液(HRP標識抗体)を用いた酵素抗体法によって検出し、封入材のEukitt(G.Kindler)を用いて検鏡試料とした。以上の始原生殖細胞の特性である抗原蛋白質に対する抗体染色およびAP染色について、選別細胞は全て陽性反応を示し(図4を参照)、in vitroでMh発現細胞として分化する細胞が生殖細胞であることが確認された。

【0047】実施例5：凝集塊移植による精子形成能の検定

12.5日目胎児雄生殖巣細胞を分散し、再凝集塊を形成させた後、成体精巣被膜下に移植した場合、約1~2カ月後には移植片内で精子形成を行うことが知られている。これは、12.5日目以降の胎児雄性生殖細胞が適切な培養環境の下で造精能を獲得することを示している。そこで、FACS精製したMh発現細胞について同様の移植実験を行い、その精子形成能の検定を行った。FACS精製したlacZノックインES由来細胞(約10⁵細胞)と12.5日目胎児雄生殖巣由来の分散細胞(約10⁵細胞)を混合し、1日間の浮遊培養によって細胞凝集塊を形成させ、この凝集塊を成体雄ヌードマウスの精巣被膜下に移植して生体内培養を行った。この凝集塊培養において宿主生殖巣由来の始原生殖細胞の生存頻度は極めて低くであり、仮に混入したとしてもlacZノックインES由来細胞は、そのlacZ発現能(Mh発現は精子細胞まで継続する)において容易に区別することができる。移植の2ヶ月後、移植精巣内において移植細胞塊は、独自の精細管構造を形成し、そ

の精細管内部にはES由来細胞による精子形成像が観察された(図5を参照)。对照実験として分化誘導を経ないES細胞を用いて同様の移植実験を行った場合には、宿主精巣内においてES細胞の特性に由来する腫瘍が形成された。従って、ES細胞のin vitro培養でMh発現細胞として分化する生殖細胞は、少なくとも生体培養法を用いることによって精子まで分化させることができることが判明した。

【0048】

【発明の効果】現在、遺伝子機能の解析や生殖工学を用いた応用動物の作成は、受精卵へのDNA注入或いは全能性ES細胞を用いた遺伝子組換えを主体としており、いずれの場合も遺伝子操作細胞が生殖細胞に分化し、導入遺伝形質が次世代に継代されることを基盤としている。本発明は、受精卵やES細胞という全能性細胞から生殖細胞をin vitroで分化誘導し、より迅速かつ直接的に遺伝子操作細胞由来の精子を得る技術を提供するものであり、遺伝子改変技術の効率化、簡便化に大きな寄与を果たす。また、その簡便化と高効率化を通して遺伝子改変技術の応用範囲を広げ、再生医療・畜産を始め幅広い基礎研究の発展に資する。

【0049】即ち、本発明によれば、未分化幹細胞には発現せず、分化した生殖細胞に特異的に発現するマウスVasaホモログ(Mh)遺伝子の発現を高感度に検出することができる培養細胞系が確立した。本発明は、胚性幹(ES)細胞のin vitro胚様体形成において生殖細胞の分化誘導を起こすこと、及びES細胞のin vitro分化誘導から派生した生殖細胞を分能精製することに初めて成功したものである。従って、本発明には、以下のような応用的側面が含まれる。

【0050】1. 遺伝子機能の解析のためES細胞を対象とした遺伝子改変操作が行われるのは、ES細胞が生殖細胞(精子)を通して次世代個体になる性質を持つからであり、ES細胞が持つ全能性の中で、最も欠落しやすい特性もまた生殖細胞系譜への寄与能力である。本発明は、このES細胞システムの根幹となる生殖細胞への分化能を検定するうえで、優れた実験系を提供する。

【0051】2. 従来、ES細胞を介した遺伝子改変動物の作成は、単能したES細胞を胚盤胞期胚に移植したキメラ動物の作成とそれに続くES細胞由来ヘテロ動物の作成を経て行われる。ここで、キメラ動物においてES細胞が精子形成にどの程度参画するかが、改変動物作成の成否を握る重要なステップとなる。これに対して、本発明はin vitro分化系によってES細胞から生殖細胞を選別し、さらに移植法によって直接的にES細胞由来精子を作成する技術を提供する。これは、従来法に比べて1世代短い期間でヘテロ動物を得ることができ、かつES細胞を確実に生殖系譜に導入できることが優位点となる。具体的には、生殖細胞系譜への寄与能力が極端に低下しているES細胞クローンからも確実に精子及びその産仔を得る

手段を提供する（図6を参照）。

【0052】3. 上記のことは、ES細胞がマウス以外の動物、例えば大型家畜動物や希少動物である場合、性成熟に至る世代時間や宿主初期胚および母胎の供給は、さらに困難を招く要因になる。よって、本発明のマウス以外の動物種への応用はより一層大きな意義を持つことになる。

【0053】4. 本発明の主要な要素であるin vitro培養における生殖細胞分化の確立は、生命現象の根幹を担う生殖系譜の成立や分化についての実験モデルシステムとして利用できる。例えば、ヒトを含め、生殖細胞分化に対する環境化学物質等の影響を見る評価システムへの応用が可能である。

【図面の簡単な説明】

【図1】Mvh遺伝子発現を可視化するため、相同組換え操作によってlacZおよびGFP遺伝子をノックインしたES細胞クローンを作成した。図1の上段は、その設計図を模式的に示し、下段はゲノムサザン解析によって判別される2種のノックインES細胞の検定結果を示す写真である。これらのクローンでは生殖細胞特異的なMvh遺伝子発現がlacZ（クローン#417）およびGFP（クローン#37）遺伝子の発現として識別される。

【図2】図2は、胚様体形成によるMvh発現細胞の出現を示す顕微鏡写真である。GFPノックインES細胞を使用して胚様体形成を行い、培養後0、2、3、5日目の形態とGFP発現（Mvh発現）細胞の出現を観察した。培養後、3日目以降において、一部の胚様体にGFP発現（Mvh発現）細胞の出現が検出された。右は明視野像、左はその暗視野蛍光像を示す。

【図3】図3は、BMP4強制発現細胞との共培養の効果とFACS選別による精製を示すチャート及び顕微鏡写真である。胎児期生殖隆起由来の中胚葉性細胞株ML5細胞について、BMP4強制発現ベクターを導入した細胞株を樹立した。ES細胞クローンと親株ML5を混合して凝集培養した場合にはGFP（Mvh遺伝子発現）陽性細胞の出現は見られないのに対し、BMP4発現ML5細胞との混合では、わずか1日間の培養で既にGFP陽性細胞の出現が観察され、その出現頻度も約3%にまで増加した。ES細胞単独の場

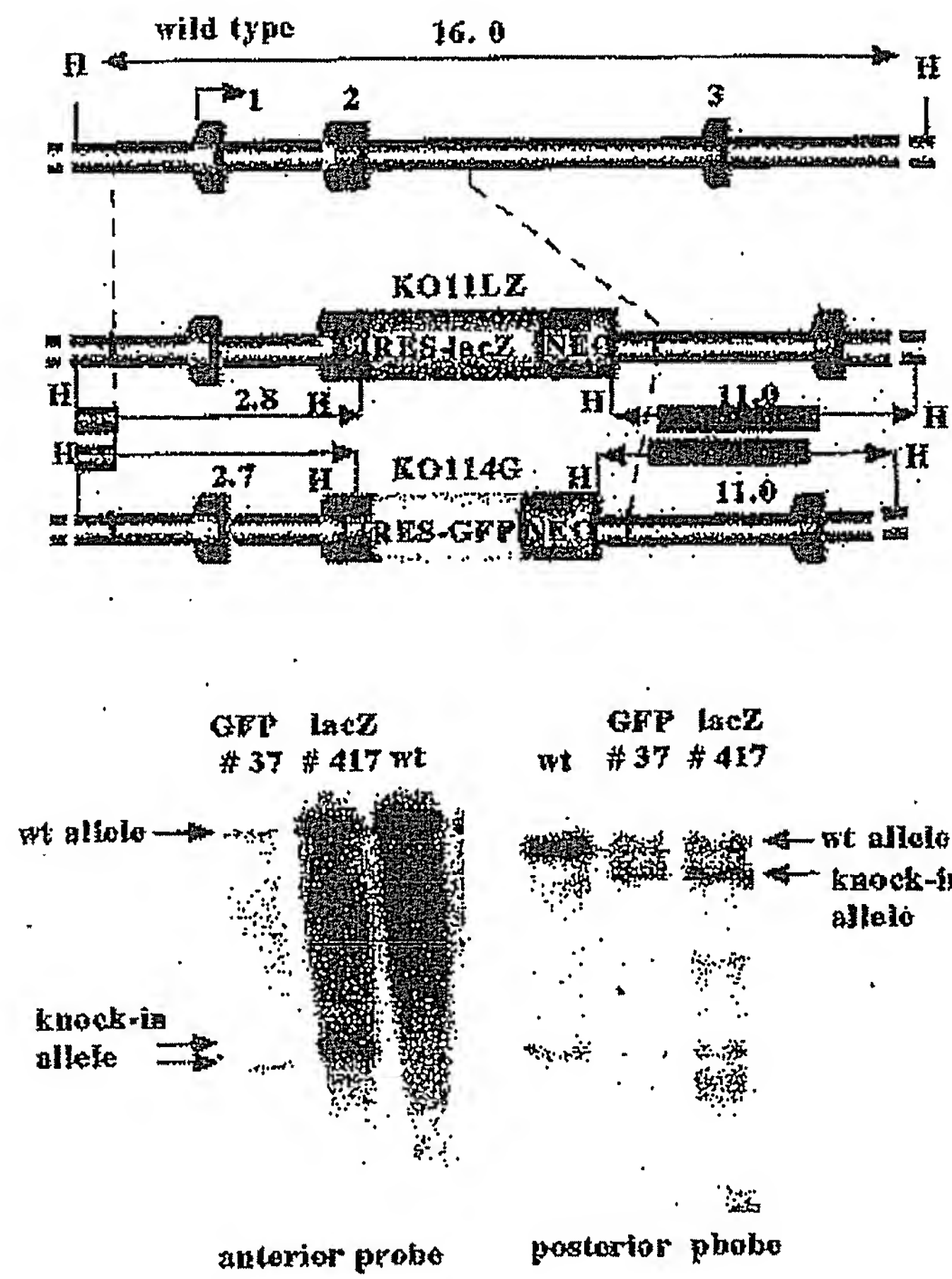
合、GFP（Mvh遺伝子発現）陽性細胞の出現は見られないのに対し（上段）、BMP4強制発現細胞との共培養の場合、培養1日目においてMvh発現細胞が観察された（中段）。さらに、その陽性細胞分画を再度FACS選別に掛けることによって高純度のMvh発現細胞が回収された。右の染色像は、それぞれの分画の抗Mvh抗体によるMvh発現の検定をしたもので、上段が抗体染色、下段はその明視野像を示す。

【図4】図4は、FACS精製されたMvh発現細胞の特性解析を示す顕微鏡写真である。即ち、図4は、FACSにより培養5日目の胚様体中出现するGFP(Mvh)発現細胞を解析した結果を示す。分散した胚様体細胞にPI染色を行い、染色された細胞は死細胞として解析の対象から分別した。Mvh発現細胞の割合は0.3〜0.5%であった。上段6枚は、精製された細胞を抗Mvh抗体、抗TRA98抗体、抗Oct3/4抗体、抗Sycp3抗体およびAP染色により染色した結果を示す顕微鏡写真である。精製されたMvh発現細胞はこれらの染色について陽性であった。control像は培養1日目の胚様体細胞を分散したものを抗Mvh抗体により染色した結果をコントロール実験区として示している。この場合染色性を示す細胞は観察されなかった。下段2枚は、培養5日目の胚様体を分散し、抗Mvh抗体（左）および抗Sycp3抗体（右）にて2重染色した結果を示す顕微鏡写真である。Mvh発現細胞とSycp3発現細胞は一致することが判明した。

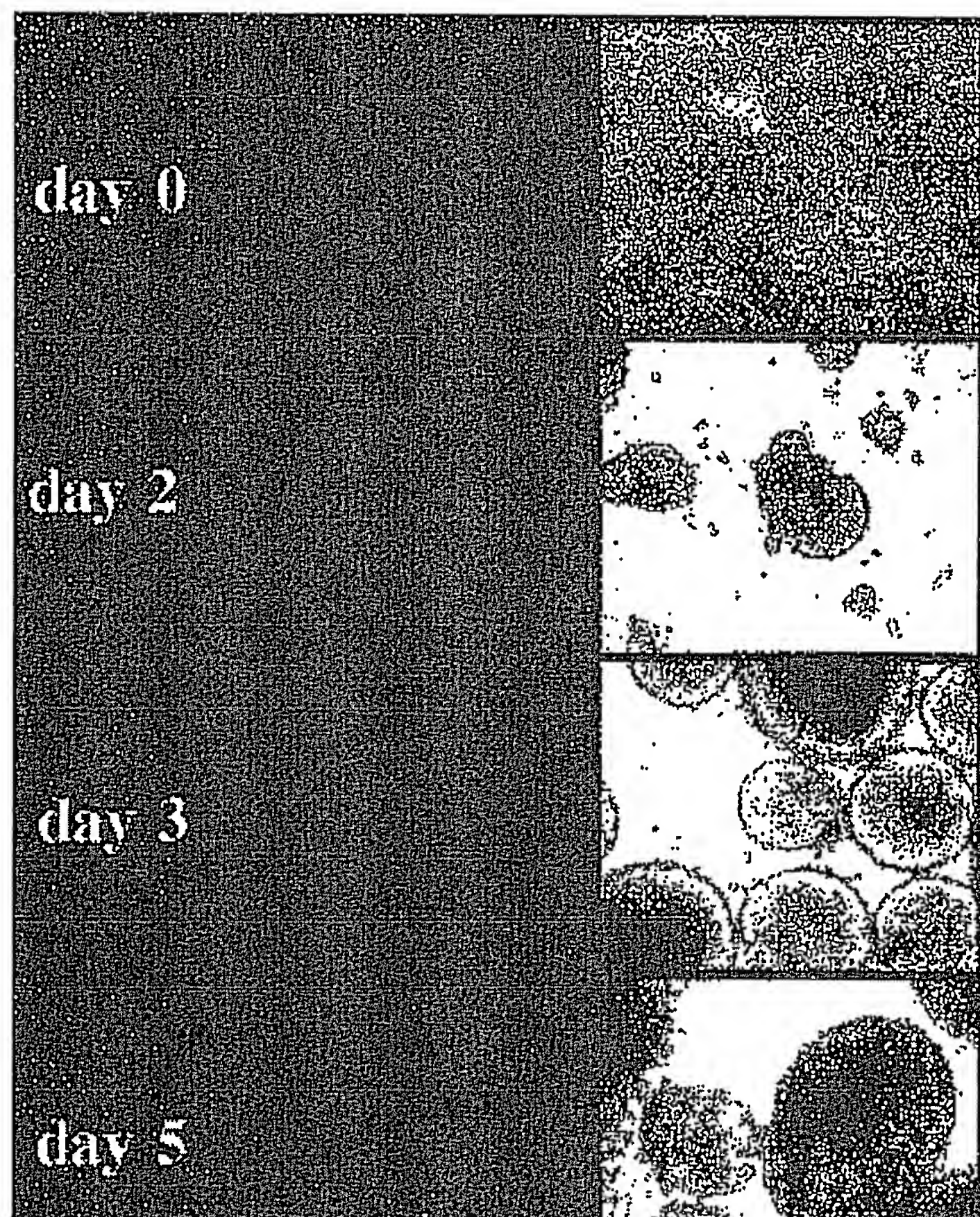
【図5】図5は、Mvh発現細胞の生体移植によって生じた精子形成像を示す顕微鏡写真である。FACS精製したlacZノックインES由来細胞と12.5日目胎児雄生殖巣由来の分散細胞を混合した細胞凝集塊を成体精巣被膜下に移植した結果、移植後2ヶ月目において宿主精巣内において移植細胞塊は、独自の精細管構造を形成していた（上段）。その精細管は、X-gal染色によって強い陽性染色細胞で満たされ、lacZノックインES細胞に由来することが判る。精細管内部には、lacZノックインES由来細胞による精子形成像が観察された（下段）。

【図6】図6は、本発明と従来法の比較を示す模式図である。

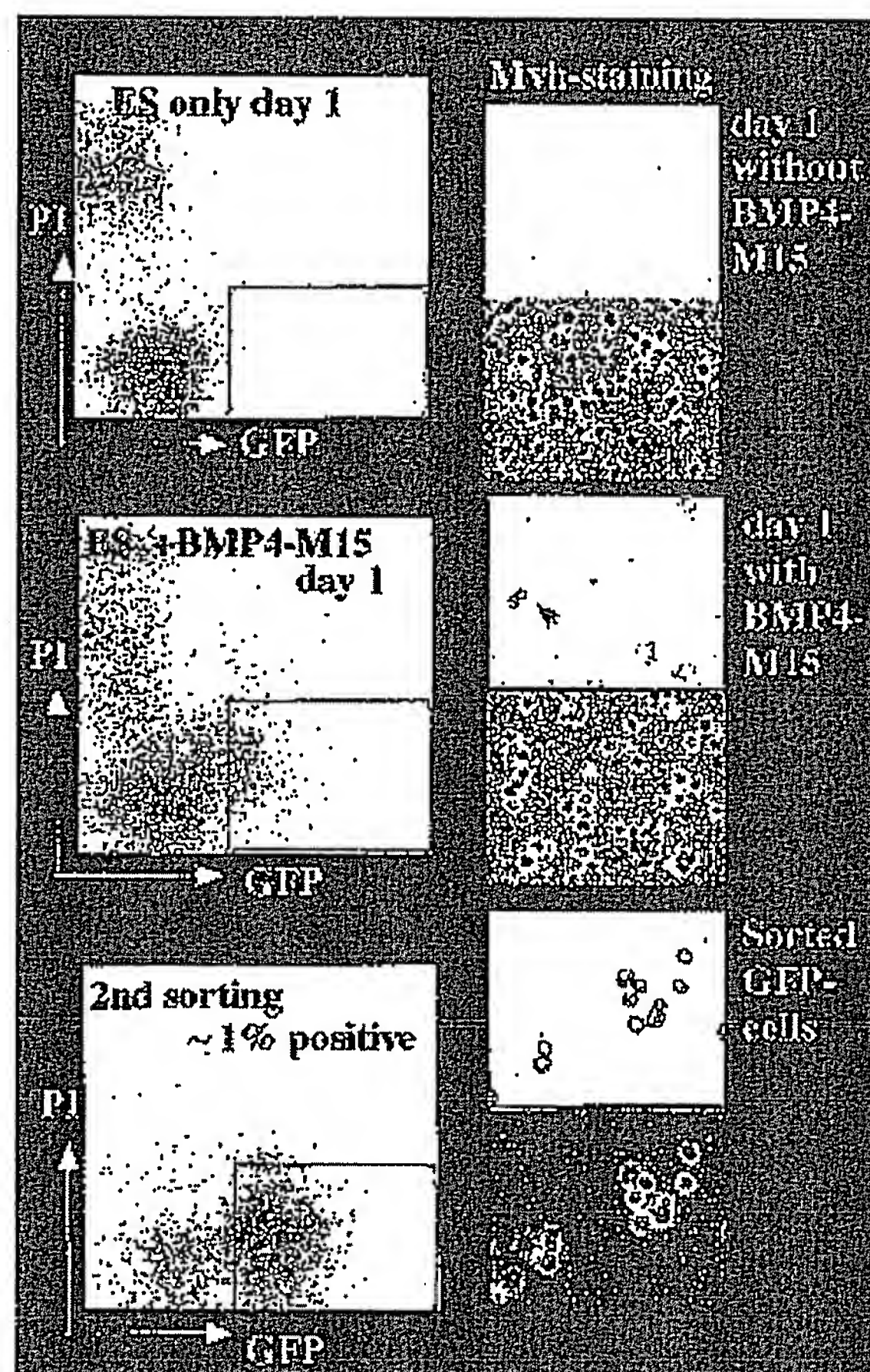
[図1]



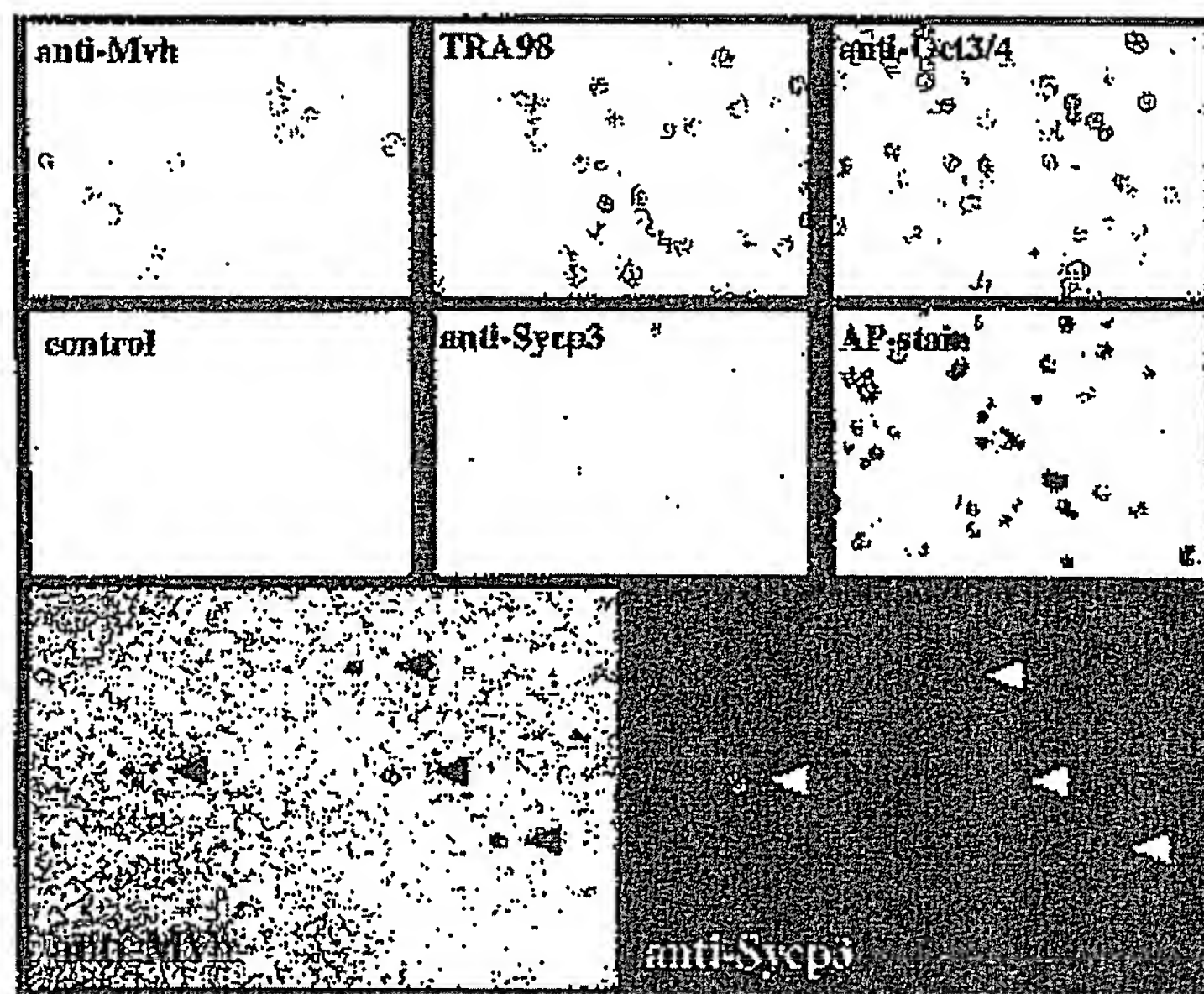
【図2】



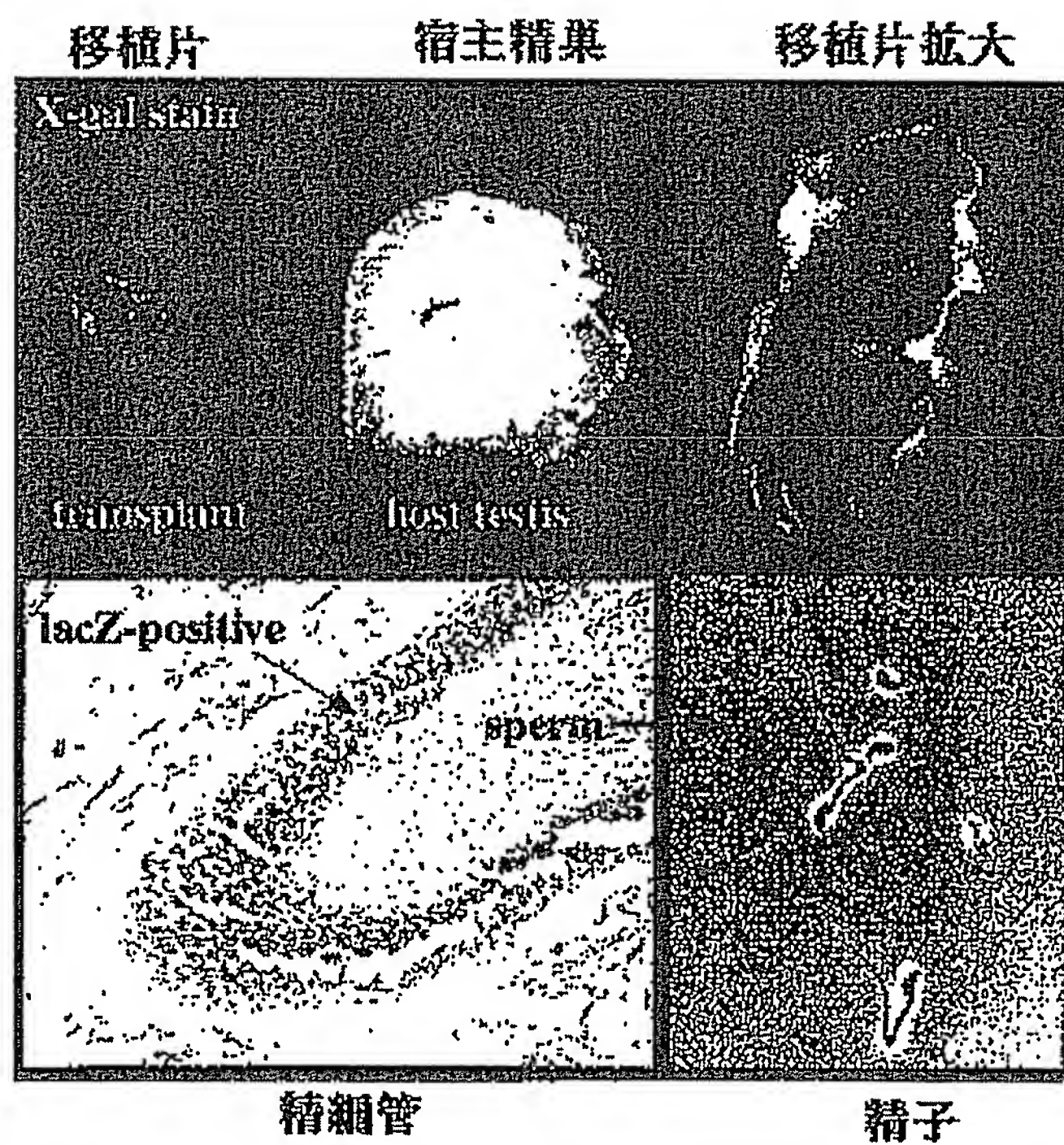
【図3】



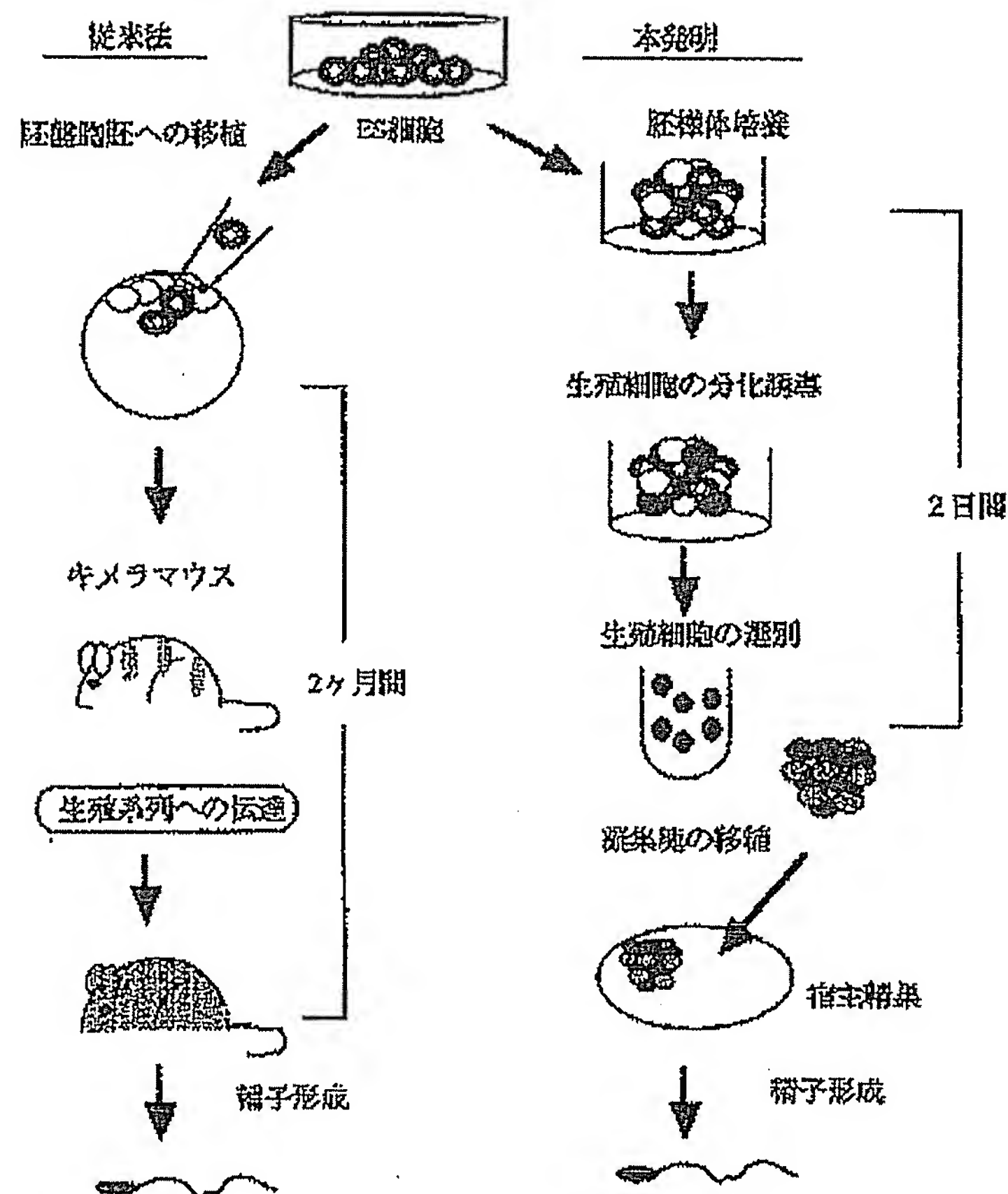
【図4】



【図5】



【図6】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.

識別記号

F i

サーチコード (参考)

G 0 1 N 33/15
33/50C 1 2 N 15/00
5/00A
B

F ターム (参考) 2GG45 BB1G BB14 BB2G BB2Z BB24
BB51 CB01 CB17 FA16 FB01
FB03
4BG24 AA1G AA2G BA8G CA04 DA0Z
EA04 GA11 HA2G
4BG53 QA01 QA05 Q22G QR8G QX01
4BG55 AA9GX AA9GY AB01 BA0Z
CA46 CA5G